

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТЕНКИ ВЕН ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПОСТТРОМБОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

*Сушков С.А., Небылицин Ю.С., Самсонова И.В., Клопова В.А.,
Пасевич Д.М., Демидов С.И., Кондратьева В.И.*

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Актуальность. Посттромботический синдром (ПТС) нижних конечностей развивается на фоне тяжелых морфологических изменений в глубоких венах в виде неполной реканализации, повреждения клапанного аппарата и снижением объемной и линейной скорости венозного оттока [1].

Одной из причин развития и прогрессирования хронической венозной недостаточности нижних конечностей является дисфункция эндотелия кровеносных сосудов. Изучение, разработка и внедрение в практику методов диагностики эндотелиальной дисфункции, определение маркеров прогнозирования течения венозной недостаточности, а также совершенствование методов лечения ПТС являются актуальными.

Цель. Изучить экспрессию кластера дифференцировки CD31 в стенке вен при моделировании посттромботического синдрома.

Материал и методы. Материалом для морфологического исследования служили тромбированные вены 110 крыс (в качестве контроля исследовалась 10 здоровых крыс). Забор материала производили через 1, 3, 6, 24 часов, на 3-е, 6-е, 15-е, 30-е, 45-е и 90 сутки после операции.

После фиксации в 10% растворе нейтрального забуференного формалина и стандартной гистологической проводки готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивались общегистологическими методами: гематоксилином и эозином, по Харту, по методу ван Гизон, по Эйнарсону, по Гейденгайну [2], а также иммуногистохимически с использованием моноклональных антител Bond RTU Primary CD31. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов проводили с использованием роботизированной станции по иммуногистохимическому окрашиванию препаратов Bond™ – MAXProcessingModule (производства BiosystemsMelbournePtyLtd, Австралия) с использованием протоколов окрашивания и рекомендаций Leica. В качестве визуализирующей системы при проведении иммуногистохимического исследования использовали Bond Polymer Refine Detection (Leica, UK), включающую комплекс вторичных антител и диаминобензин (ДАБ) в качестве хромогена и гематоксилин для докраски препаратов.

Морфологические изменения в образцах вен и характер экспрессии CD31 по отношению к основным структурным компонентам венозной стенки оценивали с помощью световой микроскопии при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 630$ (микроскоп Leica DM 2000 с цифровой камерой). Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной системы анализа изображений (лицензионная программа Leica Application

Suite, Version 3.6.0). Каждый препарат, окрашенный моноклональными антителами к CD31, фотографировали в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$. Обработку цифровых изображений производили с использованием программы WCIF ImageJ 1,45s. При этом количественно оценивали площадь гистологического препарата и площадь положительно проэкспрессировавших клеток в составе основных компонентов венозной стенки.

Результаты. Результаты проведенного нами исследования экспрессии CD31 в контрольных образцах бедренной вены показали наличие маркера в эндотелиоцитах, а также периваскулярных и адвентициальных элементах сосудов. При этом подавляющее количество CD31+ клеток располагались, в основном, в интима. В изученных препаратах слой эндотелиоцитов в интима вены был равномерным и выявлялся на всем протяжении венозной стенки. Результаты программного анализа изображений интенсивности экспрессии CD31 в т.н. «горячих точках» (hot spot) – местах с наиболее высокой концентрацией капилляров и с максимально выраженной экспрессией маркера – показали изменение степени его экспрессии в экспериментальном материале. Через 1 час после экспериментального моделирования ПТС морфометрически установлено, что площадь экспрессии CD31 по отношению к общей площади образца в образцах бедренной вены экспериментальных животных была существенно выше контрольных показателей и составила – $0,013 \pm 0,0008 \mu\text{m}^2$ (в контроле – $0,008 \pm 0,0005 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). Через 3 и 6 часов после экспериментального моделирования ПТС площадь экспрессии CD31 по отношению к общей площади образца в образцах снижалась и приближалась к контрольным показателям – $0,0085 \pm 0,0005 \mu\text{m}^2$ и $0,0087 \pm 0,0003 \mu\text{m}^2$ соответственно. Морфометрическая оценка экспрессии CD31 в образцах бедренной вены через 1 и 3 суток после экспериментального моделирования ПТС выявила дальнейшее снижение площади экспрессии CD31 по отношению к общей площади образца. Максимально низким данный показатель был на 6-е и 15-е сутки – $0,00055 \pm 0,00002 \mu\text{m}^2$ и $0,0005 \pm 0,00002 \mu\text{m}^2$ (в контроле – $0,008 \pm 0,0005 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). Через 30 суток после экспериментального моделирования ПТС морфометрически установлено, что площадь экспрессии CD31 по отношению к общей площади образца в образцах бедренной вены экспериментальных животных увеличивалась и достигала максимума – $0,01620 \pm 0,0006 \mu\text{m}^2$ (в контроле – $0,008 \pm 0,0005 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). Через 45 и 90 суток экспрессия CD31 приближалась к показателям контрольной группы и не имела статистических отличий: $0,0077 \pm 0,0004 \mu\text{m}^2$ и $0,0076 \pm 0,0005 \mu\text{m}^2$ соответственно.

О лабильности эндотелия в ранние сроки свидетельствовало изменение экспрессии CD31. Эти изменения отражают реакцию эндотелия, направленную на восстановление структуры и функции венозной стенки. Ранее в экспериментах на животных показано, что дефицит CD31 сопровождается нарушением трансэндотелиальной миграции лейкоцитов в

очаг воспаления, нарушением созревания В-лимфоцитов; кроме того отмечалось развитие гиперчувствительности и аутоиммунных заболеваний [3]. Показано также, что адгезивные и сигнальные свойства молекулы PECAM-1 обеспечивают миграцию эндотелиальных клеток, что является главным звеном в процессе ангиогенеза, а следовательно в процессах реваскуляризации и реканализации при тромбозе. Увеличение экспрессии CD31 в динамике связано с адаптивной реакцией в ответ на нарушение венозного оттока, когда эндотелий начинает работать как «биосинтетическая машина», что соответствует I стадии функциональной перестройки эндотелия [5]. Резкое снижение экспрессии CD31 к 6-м суткам свидетельствовало об истощении функционального резерва эндотелиальных клеток в интимае, что согласовалось с выявленной нами десквамацией эндотелия к этим срокам. Начиная же с 15-х суток, отмечался рост экспрессии CD31, что отражает процессы ангиогенеза как составляющей процессов организации тромба с появлением сосудистых щелей и каналов (реваскуляризация и реканализация). Сроки 45-90 суток характеризуются завершением процессов организации тромба и восстановлением эндотелиального монослоя. В указанные сроки происходило восстановление экспрессии CD31 до показателей контрольных значений.

Заключение. Структурные изменения эндотелиального слоя внутренней оболочки стенки сосудов сопровождаются изменением экспрессии маркера CD31, что указывает на патогенетическую значимость в развитии патологического процесса и определяет необходимость применения фармакологических препаратов, корригирующих состояние эндотелия на ранних этапах развития посттромботического синдрома.

Литература:

1. Введение в ангиологию и сосудистую хирургию / Е. Л. Бурлева [и др.]. – Екатеринбург : Баско, 2015. – 309 с.
2. Шабалова, И. П. Основы клинической цитологической диагностики / И. П. Шабалова, Н. Ю. Полонская. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 144 с.
3. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease / R. Wilkinson [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 100. – P.184–119.
4. Dipietro, L Angiogenesis and scar formation in healing wounds / L. Dipietro // Current opinion in rheumatology. – 2013. – Vol. 1. – P. 87–91.
5. Дисфункция эндотелия при острой и хронической венозной недостаточности / Ю. С. Небылицин [и др.] // Новости хирургии. – 2008. – № 4. – С.141–153.